° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A.O. 3643

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

par

Monsieur Michel BORNENS

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : LES PHOSPHOLIPIDES DU NOYAU ET DE LA MEMBRANE NUCLEAIRE DU FOIE DE RAT.

Soutenue le 14 octobre 1969 devant la Commission d'Examen

MM. M. PASCAUD — Président

C. FRAYSSINET)
) — Examinateurs
P. FAVARD)

UNIV.
LEIDEN.
BIBL.

BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE.
Extrait du Tome 50, n° 3, 1968, p. 591.

Printed in France.

PHOSPHOLIPIDES NUCLÉAIRES DU FOIE DE RAT EN HYPERTROPHIE COMPENSATRICE.

par Michel Bornens.

Centre de Recherches sur la Cellule Normale et Cancéreuse, Boîte Postale N° 8 — 94 - Villejuif — France. Directeur : E. Le Breton.

(Mémoire reçu en août 1967).

Résumé. — L'étude quantitative des différents phospholipides du noyau de foie de rat, durant les 72 premières heures de l'hypertrophie compensatrice qui suit l'ablation de 70 p. 100 du foie, a été réalisée après leur séparation par chromatographie en couche mince. L'incorporation du ^{32}P dans les phospholipides nucléaires (2 heures après injection intrapéritonéale) a également été mesurée pour chaque stade postopératoire étudié.

Les faits suivants peuvent être mis en évidence :

1. La quantité par noyau des phospholipides totaux est très constante durant toute la période étudiée, légèrement supérieure (de 15 à 20 p. 100) à celle trouvée dans les noyaux de foie normal.

2. Les phosphatidyléthanolamines présentent, très précocement, une synthèse importante ($>$ 90 p. 100) qui est maximum à la 18e heure après l'opération. La quantité de phosphatidyléthanolamines par noyau reste élevée durant toute la période étudiée.

3. Les phosphatidylinositols montrent une importante augmentation de leur vitesse de renouvellement peu avant la synthèse de DNA et une augmentation de leur quantité par noyau (45 p. 100) au moment des mitoses.

4. Les quantités par noyau des différents lipides à choline sont peu modifiées.

Les lécithines et lyso-lécithines présentent des vitesses de renouvellement qui augmentent parallèlement durant toute la période étudiée mais surtout juste après les mitoses. L'augmentation de la vitesse de renouvellement des lyso-lécithines est toujours beaucoup plus importante que celle des lécithines.

Ces résultats nous permettent de postuler certains rôles spécifiques des différents phospholipides en liaison avec les événements fondamentaux de l'hypertrophie compensatrice.

Les premières données concernant la présence de lipides dans le noyau de la cellule animale furent apportées par les auteurs qui parvinrent à isoler cette structure [1-5]. Ultérieurement l'étude de la composition des lipides du noyau put être faite grâce à l'apparition de techniques d'analyse de ces constituants de plus en plus précises et fines [6-13]. Comme il

était normal, le métabolisme de ces lipides nucléaires fut abordé avec l'intention d'en rechercher les liens éventuels avec les processus impliqués dans la division cellulaire. C'est ainsi que l'évolution des phospholipides du noyau fut étudiée principalement sur des animaux en croissance [14-16], sur des tissus tumoraux [17] et sur des foies en hypertrophie compensatrice [16, 18-20]. Ce dernier matériel permet en particulier d'observer une phase prémitotique et une phase mitotique bien distinctes.

Les premiers, Smellie et al. [16], trouvèrent par injection de phosphate marqué au ^{32}P, une augmentation de l'activité spécifique des phospholipides nucléaires dans le foie de rats sacrifiés 26 heures après hépatectomie partielle. Levin et al. [18] constatent au niveau du noyau un maximum d'incorporation à la préprophase ou au début de la métaphase, cela en particulier dans les « céphalines ». A 18 heures (stade prémitotique), ils voient une augmentation de la concentration (rapportée au DNA) des trois groupes de phospholipides dosés. Frayssinet [19] étudiant l'évolution du rapport P. lipidique nucléaire/P.DNA depuis l'hépatectomie jusqu'à 16 jours après l'opération, constate que ce rapport est constant sauf au stade 48 heures où il augmente de 60 p. 100. Plus récemment, Gurr et al. [20], étudiant l'incorporation du ^{32}P-orthophosphate *in vivo* dans le foie de rat normal ou en voie de régénération, constatent que l'hépatectomie partielle n'a pas d'effet significatif sur l'incorporation du phosphate inorganique dans les phospholipides du noyau de foie de rat.

Or, au cours de recherches histochimiques, plusieurs auteurs ont montré la présence de phospholipides au niveau des chromosomes et du nucléole pendant la mitose, d'abord dans des cellules végétales, puis dans des cellules animales [21-26]. En particulier, Gahan [25] étudiant notamment le foie de rat, à l'état normal et en hypertrophie compensatrice, constate une différence de comportement vis-à-vis des colorants utilisés. Il laisse entendre que les phospholipides entreraient dans la constitution d'un matériel filamenteux qui pourrait représenter le stade précédant immédiatement la prophase. Il semblerait donc que contrairement aux résultats de Gurr et al., les phospholipides du noyau subissent une évolution au cours de l'hypertrophie compensatrice.

Il est vraisemblable que ces résultats discordants s'expliquent principalement par la variété des souches animales utilisées par les différents auteurs et par la diversité des conditions expérimentales, en particulier dans le choix des temps après hépatectomie. La revue de N. L. R. Bucher [27] sur l'hypertrophie compensatrice et les nombreuses références qu'elle rassemble montrent assez la variété des facteurs qui modifient la réponse régénérative. L'âge est en particulier un facteur déterminant.

Abréviations utilisées. — L-Lec : lyso-lécithine ; Sph : Sphingomyéline ; PhC : Phosphatidylcholine (ou Lécithine) ; PhI : Phosphatidylinositol ; PhS : Phosphatidylsérine ; PhE : Phosphatidyléthanolamine ; « PhA » : Acides phosphatidiques + Polyphosphoglycérides ; P : Phosphore ; P.DNA : Phosphore de l'acide désoxyribonucléique ; P. lipidique : Phosphore lipidique ; P. acido-soluble : Phosphore acido-soluble.

D'autre part, dans les études du métabolisme des phospholipides nucléaires où l'on utilise le ^{32}P-orthophosphate, les temps d'incorporation choisis sont souvent différents, rendant les comparaisons difficiles. Toutes ces recherches enfin ne portent que sur un temps, ou deux au plus après hépatectomie.

C'est pourquoi nous avons entrepris ici l'étude des phospholipides du noyau depuis les premières heures qui suivent l'hépatectomie partielle jusqu'à l'époque où les mitoses sont achevées. Nous avons recherché si, par noyau, la quantité totale des phospholipides et les quantités individuelles de chaque type de phospholipide subissaient des variations au cours de cet intervalle de temps. Nous avons étudié en outre la vitesse d'incorporation du ^{32}P-orthophosphate dans chacun de ces types phospholipidiques. Dans le cas où une évolution aurait lieu, il nous semble intéressant de savoir si elle est la même pour tous les phospholipides ou si, au contraire, on peut distinguer des comportements différents traduisant des rôles différents pour chacun d'eux.

Matériel et méthodes

1. *Animaux.*

Nous avons utilisé un lot de 26 rats mâles Wistar (souche Commentry) âgés de 6 mois, pesant de 300 à 350 g, nourris au régime semi-synthétique équilibré de Le Breton [28]. Nous l'appellerons la série A. Pour elle, l'ensemble des techniques décrites ci-dessous a été utilisé.

Par ailleurs, deux autres lots (de 23 rats mâles - Wistar - souche Gif) ont été utilisés ; la série B était constituée de rats âgés de 7 mois, pesant de 280 à 330 g, la série C de rats âgés de 11 mois, pesant de 300 à 370 g. Pour ces deux séries, seules l'évolution de la composition en phospholipides individuels et l'incorporation du ^{32}P ont été suivies. Les dosages de DNA et de P. acido-soluble n'ont pas été effectués.

2. *Hépatectomie partielle.*

La technique d'Higgins et Anderson [29] est utilisée, les rats étant anesthésiés à l'éther. Pour une même série, tous les rats sont opérés et sacrifiés dans la même semaine. Le sacrifice a toujours lieu sans jeûne préalable et à la même heure (14 heures) afin d'éviter l'influence du rythme nyctéméral sur la mitose. La seule exception est le stade 36 heures pour lequel le sacrifice a lieu à 11 heures 30.

Les temps choisis après ablation des 2/3 du foie sont les suivants : 6 h, 18 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h. Les résultats sont comparés à ceux obtenus sur des foies de rats témoins non opérés, la littérature montrant le peu d'effet du choc opératoire. Quatre rats sont utilisés pour les deux premiers temps et 3 pour tous les autres. Les valeurs témoins sont obtenues sur 6 rats dans la série A, sur 3 rats dans les séries B et C. Pour tous les stades, les dosages sont faits sur les noyaux obtenus à partir de l'homogénat des différents foies pris ensemble. Pour la série A, un

contrôle au microscope optique a été effectué, à chaque stade, sur un prélèvement de chaque foie hypertrophié, pour vérifier la période des mitoses.

3. *Isolement des noyaux.*

Les rats sont tués par décapitation. Les foies rapidement prélevés, lavés à l'eau glacée, essorés, et pesés, sont homogénéisés dans du saccharose 2,2 M (d = 1,28) contenant 0,05 mM de Ca^{++} par litre, selon la méthode de Chauveau et al. [5]. Toutes les opérations sont faites à 4°C. L'homogénat est centrifugé 75 minutes (Spinco, rotor 21, 20 000 rpm).

4. *Dosages biochimiques.*

Les culots de noyaux sont traités par la méthode de Schmidt et Thannhauser — modifiée par Y. Moulé [30] — en introduisant en outre la modification suivante : après l'extraction du P. acido-soluble par l'acide perchlorique à 5 p. 100, glacé, les culots sont agités avec 20 volumes de chloroforme-méthanol 2/1 (V/V). On laisse en contact 30 minutes à 1 heure. Après centrifugation, le culot est repris deux fois dans 5 ml de chloroforme-méthanol. Le reste du protocole n'est pas modifié.

Les trois extraits au chloroforme-méthanol réunis, sont lavés suivant la méthode de Folch et al. [31]. Le lavage est répété trois fois. La phase supérieure est éliminée par pipetage ainsi que le voile qui se forme à l'interface. Un dosage de phosphore est réalisé sur cette phase afin de pouvoir comparer nos valeurs à celles d'auteurs utilisant des techniques d'extraction des lipides sans lavage. La phase inférieure est évaporée à sec sous vide et à faible température (30-35°C). Séchée à l'alcool absolu, elle est reprise par du chloroforme-méthanol et portée à un volume connu (50 ml). Ayant vérifié que la proportion des graisses neutres du noyau était très faible (de l'ordre de 5 p. 100), nous n'avons pas réalisé de séparation préalable des lipides neutres.

— Deux prélèvements de 5 ml servent au dosage du P. lipidique total.

— Un prélèvement de 10 ml est effectué en vue des séparations par chromatographie en couche mince qui seront utilisées pour la mesure autoradiographique de l'activité des phospholipides individuels (voir radioactivité).

— Le reste, évaporé puis repris par 1 ml de chloroforme, est déposé sur une plaque de silicagel pour la séparation et le dosage individuel des phospholipides. L'adsorbant est du silicagel HR (Merck). Les plaques utilisées sont des plaques de 20 × 20 cm, préparées à l'aide de l'applicateur Desaga. L'épaisseur du silicagel est de 0,25 mm. L'apport est fait à l'aide du chromatochargeur Camag. La séparation est effectuée selon la technique de Skipsky et al. [32] en modifiant légèrement la teneur du solvant de migration en eau (comme le laissent d'ailleurs prévoir les auteurs) et aussi en acide acétique. Sa composition est finalement la suivante :

Chloroforme-méthanol-acide acétique-eau 50-30-13-5 (V/V). On obtient ainsi une bonne séparation des principaux types de phospholipides.

La nature phospholipidique des constituants a été vérifiée par vaporisation du réactif de Dittmer et al. [33], les lipides à choline ont été révélés par le réactif de Draggendorf. Les lipides possédant une base avec une fonction amine libre l'ont été par vaporisation de ninhydrine en solution acétonique. La partie non lipidique de chaque constituant a été identifiée par N. Munsch (*). Outre les catégories classiquement séparées, un constituant de faible importance quantitative (3 p. 100), positif à la ninhydrine, se sépare fréquemment des phosphatidylcholines et se situe entre les phosphatidylcholines et les phosphatidylinositols (cf. Fig. 6). Mais la séparation de ce composé n'étant pas toujours parfaite, nous l'avons groupé systématiquement avec les phosphatidylcholines dans toutes les analyses. Pour être complet, il faut ajouter que le spot correspondant aux phosphatidylcholines recouvre, dans sa partie inférieure, un petit spot également positif à la ninhydrine et qui ne se sépare jamais des lécithines proprement dites.

Une fois la séparation achevée, les lipides sont repérés par exposition aux vapeurs d'iode. Après totale évaporation de l'iode, les différentes zones sont recueillies par grattage selon Skipsky et al. [32], en mouillant le silicagel. L'élution est modifiée comme suit : après transfert dans des tubes à centrifugation, les phospholipides sont élués par 20 ml de chloroforme-méthanol 2/1 puis 4 fois par 10 ml de méthanol. Les éluats sont évaporés à sec sous vide, séchés, repris par du chloroforme-méthanol et mis en matras pour le dosage du phosphore sur la totalité de chaque zone. Pour les phosphatidylcholines, le dosage est fait sur une partie aliquote.

Tous les dosages de phosphore sont réalisés selon Machebœuf et Delsal [34].

5. *Expression des résultats.*

La technique d'Higgins et Anderson [29] d'ablation partielle du foie permet de connaître le poids du lobe laissé en place. Frayssinet [19] a montré par une étude statistique qu'avec cette technique, on enlève environ 70 p. 100 du foie et que 29 p. 100 restent en place (69,65 ± 0,5 et 28,85 ± 0,5 respectivement).

Il est donc possible de calculer la quantité globale d'un constituant quelconque dans le lobe laissé en place d'après la quantité trouvée dans les foies témoins. D'autre part, on peut mesurer la quantité du même constituant dans le même lobe après qu'il a été le siège d'une hypertrophie compensatrice. La différence entre ces deux quantités correspond à la synthèse nette du constituant durant la période de régénération et représente le résultat quantitatif global de tous les phénomènes qui se sont produits. Pour un constituant nucléaire, il peut y avoir eu aussi bien synthèse intranucléaire qu'importation à partir du cytoplasme, exportation vers le cytoplasme ou synthèse de nouveaux noyaux au moment des divisions cellulaires.

(*) Centre de Recherches sur la Cellule Normale et Cancéreuse — 94 - Villejuif.

Pour calculer la synthèse nette d'un constituant nucléaire, il faut passer par l'intermédiaire du DNA présent dans le culot de noyaux puisque le rendement d'extraction des noyaux n'est pas constant. Le rapport de la quantité du constituant étudié à la quantité du DNA est la seule donnée quantitative que puisse fournir l'analyse d'un culot. C'est en fait la quantité du constituant par noyau que l'on obtient ainsi. Pour obtenir la valeur de la quantité de ce constituant présente dans le lobe examiné, il faut connaître et le poids du lobe et la quantité de DNA par gramme de foie qui révèle, selon le temps écoulé depuis l'hépatectomie partielle, soit une augmentation du poids moyen des cellules, soit une augmentation de leur nombre. On sait en effet que l'hépatectomie partielle entraîne une hypertrophie sensible qui précède l'hyperplasie. Ce calcul repose sur le fait que la quantité de DNA par cellule est constante. Cela n'est vrai qu'en première approximation. Nous ne tenons pas compte de la polyploïdie qui existe dans certaines cellules hépatiques ni de la variation de nucléation et de polyploïdie qu'on peut constater après hépatectomie partielle [35].

Nous n'avons pas mesuré nous-même la quantité de DNA par gramme de foie ; nous avons utilisé les chiffres de G. Delhumeau de Ongay et al. [36] concernant l'évolution du poids moyen d'une cellule hépatique durant l'hypertrophie compensatrice. Cela nous a paru légitime pour la partie de cette étude portant sur des rats de même souche, issus du même élevage et donnant une réponse mitotique à la même période. De toute façon, ce correctif, qui nous semble nécessaire pour avoir une vue plus réelle de l'ampleur en valeur absolue des phénomènes, ne modifie pas l'allure générale de l'évolution des synthèses nettes. Nous avons fait figurer dans ce mémoire les courbes de synthèse nette non corrigées et corrigées pour le montrer (*).

Les quantités par noyau, c'est-à-dire les valeurs du rapport µg de phosphore du constituant étudié/µg de P.DNA, seront données également, avant les valeurs de synthèse nette, afin que l'on puisse voir nettement ce qui dans la synthèse nette est dû à la multiplication cellulaire et ce qui est dû à toute autre cause ayant entraîné une variation de la quantité par noyau.

6. *Radioactivité.*

L'isotope est sous forme de $NaH_2\ ^{32}PO_4$ en solution neutre contenant du NaCl. Les rats en reçoivent par injection intrapéritonéale et 2 heures avant le sacrifice un volume contenant près de 400 µC, soit respectivement, pour les animaux hépatectomisés, 4 h, 16 h, 22 h, 34 h, 46 h et 70 h après hépatectomie partielle. Les activités du P. acido-soluble, du P. lipidique et celle du P.DNA sont mesurées au compteur à scintillation liquide Tricarb Packard. Le rendement de l'appareil est voisin de 70 p. 100.

(*) Nous exprimons les résultats en pourcentage de synthèse nette, soit :

$$\frac{Q_1 - Q_0}{Q_0} \times 100$$

Q_0 = quantité totale d'un constituant dans le lobe hépatique laissé en place,

Q_1 = quantité retrouvée dans le lobe hypertrophié.

L'activité des phospholipides individuels est mesurée par densitométrie sur les films d'autoradiographie. Une dépose ponctuelle ou en trait est faite sur une plaque de silicagel de 5 × 20 cm. Après migration dans le solvant habituel, la plaque, avant d'être séchée, reçoit une pulvérisation de polyvinyl propionate (Neatan-eg. Merck). Après complet séchage, la plaque est mise sous un film Kodak (Kodirex-film de sécurité pour radiographie), durant cinq jours.

Les films révélés sont lus au densitomètre Chromoscan (Joyce-Loeb, Suresnes) en transmission, par balayage complet de l'échantillon à l'aide d'une fente de 1 × 0,3 mm. La linéarité de la réponse dans les conditions où nous nous sommes placé avait été vérifiée, par comparaison avec le comptage au Tricarb après élution de chaque constituant lipidique. Seuls les constituants de très faible activité (inférieure à 2 p. 100 de l'ensemble) sont sous-estimés de 15 à 30 p. 100. S'ils donnent lieu à des spots étalés en raison de leur Rf de migration (cas des phosphotidylsérines), leur activité n'est pas mesurable. Pour tous les autres, l'écart avec la méthode de référence est au maximum de 6 p. 100.

Les activités des phospholipides individuels sont obtenues en pourcentage de l'activité totale. En rapportant ces pourcentages aux valeurs obtenues par comptage à scintillation liquide pour le P. lipidique total, on obtient l'activité des phospholipides individuels.

— Les résultats sont exprimés soit en activité spécifique : coups par minute par µg de P.

soit en activité spécifique relative, c'est-à-dire activité spécifique × 10^3/activité spécifique du P. acido-soluble nucléaire.

Dans les deux cas, les valeurs sont rapportées aux activités injectées qui ne sont pas toujours exactement 400 µC.

Résultats.

1. *Hypertrophie compensatrice et mitoses.*

L'ampleur de l'hypertrophie compensatrice a été contrôlée par la mesure de la synthèse pondérale ; pour la série A, l'époque des divisions cellulaires a été déterminée par un contrôle microscopique et par la mesure de l'activité spécifique du P.DNA.

a) *Evolution pondérale.* — Les valeurs obtenues dans chaque série sont portées sur les courbes de la Fig. 1. L'allure de ces courbes est classique. Après une diminution de poids dans les premières heures due à l'épuisement des réserves hépatiques [19], la synthèse suit une courbe sigmoïde. Les courbes des séries B et C ont une pente un peu plus grande que celle de la série A. Elles atteignent un maximum plus tôt et cette valeur maximum est inférieure à celle de la série A. Cela peut être dû à la différence de souche des rats. La synthèse pondérale maximum dans la série C est elle-même inférieure à celle de la série B, de même que

pour cette série, la chute de poids dans les premières heures est beaucoup plus importante que celle des séries A et B. Cela est vraisemblablement lié à l'âge des animaux de cette série.

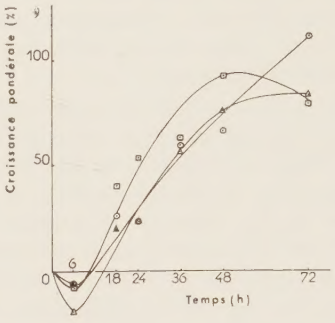

FIG. 1. — Evolution de la synthèse pondérale au cours de l'hypertrophie compensatrice, exprimée en pourcentage de variation par rapport au poids de foie laissé en place après hépatectomie des 2/3 du foie.
⊙—⊙ : Série A ; □—□ : Série B ; Δ—Δ : Série C.

b) *Division cellulaire.* — Le contrôle microscopique indique que pour la série A, l'hyperplasie s'installe entre la 24e heure et la 48e heure après hépatectomie, avec un maximum à 36 heures. L'évolution de l'activité spécifique du P.DNA nous renseigne de façon plus précise (fig. 2). On voit que le pic d'activité spécifique est très nettement situé au temps 24 heures. L'augmentation débute brutalement à la 18e heure. Cela est tout à fait en accord avec ce qui est connu concernant l'hypertrophie compensatrice chez la majorité des souches de rats quand on les prend à cet âge, c'est-à-dire un seul pic d'activité spécifique, et dans une période relativement courte. Le sommet du pic correspond à la synthèse maximum de DNA dans le lobe en hyperplasie. La synthèse de DNA précède elle-même de 8 heures environ la mitose, dans la cellule du foie en régénération [37]. Les 26 heures (environ) qui suivent l'hépatectomie représentent donc la phase prémitotique alors que la période allant de la 26e heure à la 42e heure après l'hépatectomie constitue la phase mitotique.

2. *Evolution du phosphore acido-soluble nucléaire* (*).

Le P. acido-soluble représente le pool des précurseurs nécessaires à toutes les synthèses qui précèdent la mitose. Pour la série A, la courbe d'activité spécifique de cette fraction est également portée Fig. 2. On constate à la 6e heure, une valeur légèrement plus faible que celle obtenue chez les témoins. Après 18 heures, l'activité a doublé. Les valeurs diminuent ensuite jusqu'à la 36e heure mais restent supérieures de 30 p. 100 environ à la valeur témoin jusqu'à la 72e heure. La signification du pic à 18 heures nous semble être une moindre utilisation de précurseurs à ce

(*) Cette fraction phosphorée contient, bien entendu, le phosphate inorganique.

moment-là. La valeur inférieure à celle du témoin, trouvée dans les premières heures qui suivent l'opération, est vraisemblablement la marque d'une utilisation accrue de nucléotides marqués pour les synthèses de RNA polymérase et de RNA nucléolaire et nucléaire qui se déroulent à ce moment-là [38-41]. L'incorporation de ^{32}P dans le DNA, qui commence vers la 18e heure, explique vraisemblablement la chute d'activité du pool précurseur jusqu'à 36 heures. Ensuite, pendant la phase de reconstitution cellulaire, l'activité spécifique du P. acido-soluble reste constamment supérieure à la valeur témoin.

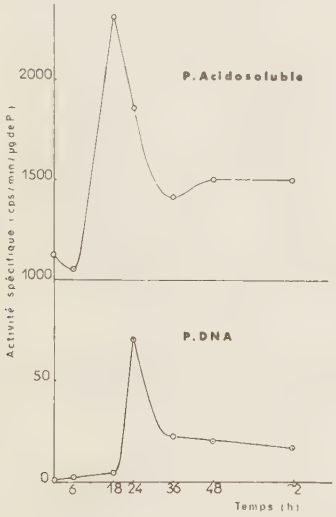

Fig. 2. — Activités spécifiques du P. acido-soluble nucléaire et du P.DNA, et pour chaque temps étudié après l'hépatectomie partielle, après 2 heures d'incorporation du précurseur (Série A).

Le rapport P. acido-soluble/P.DNA ne varie que dans de faibles proportions autour de la valeur témoin qui est de 0,08. Très légèrement abaissé dans les premières heures, il devient supérieur à partir de 36 heures et le reste jusqu'à 72 heures, à raison de 20 p. 100.

3. *Evolution quantitative du P. lipidique nucléaire.*

Les valeurs du rapport P. lipidique/P.DNA et de la synthèse nette du P. lipidique nucléaire obtenues avec la série A sont portées dans le Tableau I.

On constate aussi bien pour le P. lipidique proprement dit que pour le P. lipidique non lavé que le rapport au P.DNA est remarquablement constant pour tous les temps après hépatectomie, après la légère augmentation au début ; les valeurs sont en effet toujours légèrement supérieures (de 15 à 20 p. 100) à la valeur trouvée chez les témoins. Nous n'observons donc pas l'augmentation importante de ce rapport trouvée

par certains auteurs. La quantité totale de phospholipides par noyau reste pratiquement la même tout au long des transformations dont le noyau est le siège.

TABLEAU I

Série A. — Evolution quantitative du P. lipidique nucléaire

Temps après hépatectomie (h)	µg P. lipidique/µg P.DNA		Synthèse nette (p. 100)
	Après lavage	Sans lavage (1)	
0	0,09	0,10	
6	0,11	0,12	6
18	0,11	0,12	23
24	0,10	0,11	16
36	0,10	0,11	40
48	0,11	0,12	60
72	0,11	0,12	113

(1) Les valeurs du P. lipidique non lavé sont obtenues en ajoutant les quantités de phosphore trouvé dans la phase supérieure du lavage de Folch à celles du P. lipidique proprement dit.

La faible synthèse nette que l'on constate dès les premières heures est le témoignage de la légère augmentation de la quantité de phospholipides dans le noyau. La synthèse nette due à la multiplication cellulaire commence entre 24 heures et 36 heures.

4. *Evolution quantitative des différents phospholipides.*

a) *En pourcentage des phospholipides totaux.*

La composition en phospholipides du noyau au cours du temps, après hépatectomie partielle, ressort pour la série A, des chiffres du Tableau II. On constate qu'il n'y a pas de modification fondamentale de cette composition : la seule variation significative concerne les phosphatidyléthanolamines dont la proportion augmente sensiblement. Chez les témoins, les proportions en PhC, PhS et PhI, dans les noyaux, sont très proches de celles qui intéressent le foie total [42]. La proportion en L-Lec par contre a toujours été trouvée beaucoup plus importante que pour le foie total : entre 8 et 10 p. 100. Celle des PhE est par contre plus faible : de 12 à 14 p. 100.

Sur la figure 3 sont portées l'évolution de cette composition en même temps que celle des séries B et C. On constate que pour les témoins, la composition est identique pour les 3 séries, sauf pour les lipides à choline de la série C dont les proportions sont très différentes (23 p. 100 de L-Lec ; 48 p. 100 de PhC ; 8 p. 100 de Sph). Ce fait qui n'est pas isolé puisqu'il se retrouve dans l'évolution de la composition après hépatectomie, sera analysé plus loin (cf. discussion).

L'évolution comparée de la composition en phospholipides des 3 séries au cours de l'hypertrophie compensatrice, montre en particulier :

— que la proportion des PhS est rigoureusement la même d'une série à l'autre et à tous les temps après hépatectomie ;

TABLEAU II

Série A. — Evolution de la composition en phospholipides nucléaires (p. 100 du P. lipidique total).

Temps après hépatectomie (h)	0	6	18	24	36	48	72
Lyso-lécithines	10,0	8,2	8,2	8,1	7,3	8,2	9,6
Sphingomyélines	4,2	3,7	3,5	4,8	3,7	3,1	3,9
Phosphatidylcholines	60,6	58,0	56,6	55,4	56,5	57,0	55,6
Phosphatidylinositols	6,6	6,1	5,0	5,2	7,1	8,0	7,1
Phosphatidylsérines	3,4	3,2	3,4	3,3	3,9	2,9	3,9
Phosphatidyléthanolamines	12,4	17,4	19,9	20,6	18,9	18,6	17,7
Acides phosphatidiques + polyphosphoglycérides	2,8	3,4	3,5	2,6	2,5	2,1	2,2

— que l'augmentation de la proportion des PhE après hépatectomie est moins régulière pour les séries B et C que pour la série A, mais qu'en moyennes, les valeurs sont cependant supérieures aux valeurs des témoins ;

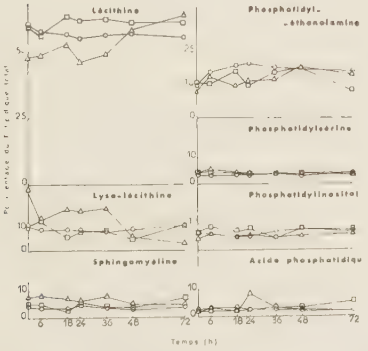

FIG. 3. — Composition des phospholipides nucléaires au cours de l'hypertrophie compensatrice, en pourcentage du P. lipidique total. ○—○ : Série A ; □—□ : Série B ; Δ—Δ : Série C.

— que les lipides à choline de la série C sont retrouvés dans les proportions des séries A et B à partir de 48 heures. Auparavant, ils restent, comme les témoins, à des valeurs très différentes : anormalement élevées pour les L-Lec surtout et pour les Sph, abaissées pour les PhC.

Pour les « PhA », la proportion élevée trouvée à 24 heures dans la série C est un fait trop isolé pour que nous le retenions.

b) *En quantité par noyau.*

L'évolution des teneurs en différents phospholipides par noyau pour la série A est représentée Fig. 4. Nous constatons tout d'abord une différence entre les lipides à choline et les autres phospholipides. Les premiers présentent des variations de faible amplitude (15 p. 100 au maximum), hormis la valeur atteinte par les sphingomyélines à 24 heures ; les autres, par contre, varient dans de plus larges proportions.

— Les phosphatidyléthanolamines présentent dès les premières heures une augmentation importante de leur quantité par noyau. Cette augmentation est supérieure à 90 p. 100 à la 18e heure et reste élevée jusqu'à 72 heures (supérieure à 70 p. 100).

— La quantité de phosphatidylinositols augmente à partir de 24 heures. Elle est maximum à la 48e heure (45 p. 100 d'augmentation). A 72 heures, elle est encore supérieure de 30 p. 100 à la valeur trouvée dans les noyaux témoins.

— La quantité de « PhA » augmente précocement (50 p. 100 à 6 heures et jusqu'à 18 heures), puis retourne à la valeur témoin dès 30 heures.

— La quantité de phosphatidylsérines est légèrement augmentée durant toute la période étudiée, avec les valeurs maxima (30 p. 100 d'augmentation) à 36 heures et 72 heures.

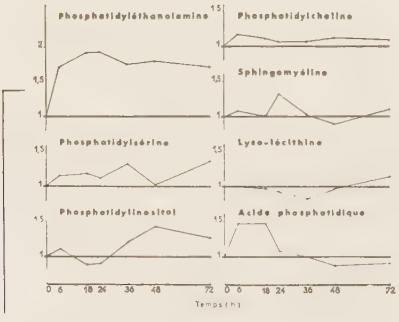

Fig. 4. — Evolution de la quantité, rapportée au DNA, des divers phospholipides nucléaires de la série A. Pour chacun, la valeur de la quantité chez le témoin est prise comme unité.

On voit donc que la faible variation de la teneur globale en P. lipidique du noyau est la résultante de variations diverses, parfois importantes, des quantités des différents phospholipides individuels. Le composé le plus important en masse (lécithines), variant très peu, et ceux qui varient notablement étant assez faiblement représentés, il est normal que la quantité globale soit sensiblement constante.

c) *En synthèses nettes.*

L'évolution de la synthèse nette de chaque phospholipide nucléaire de la série A est donnée Fig. 5. Comme indiqué dans les méthodes, nous avons fait figurer la courbe des valeurs de synthèse nette telles que nous pouvions les calculer avec nos résultats (trait pointillé) et la courbe corrigée en tenant compte de l'hypertrophie qui précède les mitoses (trait plein). On peut voir que l'allure des phénomènes n'est pas modifiée par la correction apportée. Le commentaire qui suit porte sur les courbes corrigées.

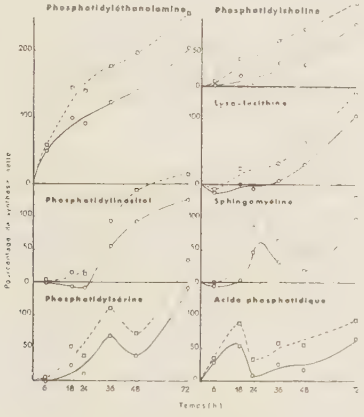

Fig. 5. — Evolution de la synthèse nette des divers phospholipides nucléaires de la série A au cours de l'hypertrophie compensatrice. Pour chaque constituant, les valeurs portées en ordonnée représentent le pourcentage de variation de la quantité totale qui était présente dans le même lobe au moment de l'hépatectomie partielle. ○——○ : courbes non corrigées ; □ ----□ : courbes corrigées (voir texte).

Chaque phospholipide semble avoir un comportement bien particulier. Mais tous présentent une courbe de synthèse nette permettant d'y distinguer les périodes prémitotique et mitotique :

— La synthèse nette des phosphatidyléthanolamines débute dès les premières heures et ne cesse d'augmenter pour atteindre plus de 200 p. 100 à 72 heures. Mais la courbe présente un point d'inflexion définissant deux parties : la première partie correspond au doublement de leur concentration dans le noyau, qui est atteint dès 18 heures ; la seconde témoigne d'un phénomène qui débute entre 24 heures et 36 heures et qui est la multiplication cellulaire.

— La synthèse nette des phosphatidylinositols débute après 24 heures et augmente rapidement. Il y a en effet deux phénomènes qui s'ajoutent ; un relèvement de leur concentration dans le noyau qui s'amorce à la 24e heure, suivi par le début de la multiplication cellulaire. Dès 48 heures, la valeur atteinte est voisine de 100 p. 100.

— La courbe de synthèse nette des phosphatidylsérines est ici encore le résultat de la superposition de la variation de leur concentration dans

le noyau et de la multiplication cellulaire. A la 72e heure, la valeur atteinte est de 140 p. 100.

— La synthèse nette des phosphatidylcholines se déclenche faiblement dès les premières heures. La pente de la courbe augmente progressivement. La synthèse nette est voisine de 100 p. 100 à 72 heures.

— Pour les lyso-lécithines, l'augmentation ne débute qu'après 36 heures. La pente de la courbe est alors plus élevée que celle de la courbe des lécithines et à la 72e heure, la synthèse nette est également voisine de 100 p. 100.

Quant à la courbe de synthèse nette des sphingomyélines, elle présente un pic entre la 24e et la 30e heure, explicable par l'augmentation de leur concentration dans le noyau. Ensuite, deux phénomènes se produisent qui évoluent en sens contraire : la baisse de leur concentration dans le noyau et la formation de nouvelles cellules. Finalement, la synthèse nette à 72 heures atteint aussi 100 p. 100.

Enfin pour les polyglycérophospholipides et acides phosphatidiques (« PhA »), l'augmentation précoce de leur concentration dans le noyau se traduit par un pic dans la courbe de synthèse nette. Celle-ci atteint environ 50 p. 100 vers la 12e heure. A la 24e heure, on retrouve pratiquement dans le lobe hypertrophié la même quantité totale que dans le lobe au moment de l'opération. Après ce stade, la synthèse nette augmente faiblement. Elle atteint 65 p. 100 à 72 heures.

De cet ensemble de courbes, il est possible de tirer quelques conclusions.

1°) Les rythmes de synthèse des « céphalines » (PhE, PhS, PhI) sont élevés (valeurs respectives atteintes à 72 heures : 205 p. 100, 140 p. 100, 125 p. 100).

— Les rythmes de synthèse des lipides à choline sont moindres (niveau de synthèse nette à la 72e heure voisin de 100 p. 100).

— Les « PhA » enfin sont ceux qui atteignent le plus bas niveau de synthèse nette à 72 heures (65 p. 100).

2°) Toutes les courbes présentent une portion terminale ascendante à pente plus ou moins forte, qui s'amorce entre la 24e et la 36e heure et se poursuit au-delà de 72 heures. Cependant, celle qui correspond aux PhI présente une allure particulière. La pente est très forte dès 24 heures, puis s'atténue progressivement à partir de 48 heures.

5. *Incorporation du ^{32}P dans les phospholipides.*

Le temps d'incorporation a été choisi assez court pour que nous ayons le reflet le plus vrai de l'activité métabolique du foie aux temps choisis. Nous avons pris 2 heures d'incorporation, ce qui, d'après la littérature [20] correspondait chez le rat normal au tout début de l'augmentation d'activité spécifique des PhE, PhC, PhS et PhI du noyau, celle des PhS étant la plus lente. Dans les séries A et C, nous n'avons effectivement

constaté une activité mesurable chez les rats témoins comme chez les autres que pour les PhE, PhI, PhC et aussi les L-Lec. Les autoradiogrammes obtenus sont présentés sur les figures 6 a et 6 b. L'activité des « PhA » et celle des PhS étaient trop faibles pour être mesurables. Par contre, les « PhA » dans la série B avaient une activité mesurable durant toute la période étudiée ainsi que chez les témoins. Il faut ajouter que le composé non identifié migrant entre les PhC et PhI (spot D) montre une activité mesurable après 2 heures d'incorporation (de l'ordre de 2 à 4 p. 100 de l'ensemble). Nous n'avons pas suivi son évolution et l'avons groupé avec les PhC. L'incorporation dans les sphingomyélines est, pour le foie total, plus tardive que pour les autres phospholipides. Il en est vraisemblablement de même pour le noyau. Nous n'avons jamais eu dans cette fraction la moindre trace d'activité après 2 heures d'incorporation.

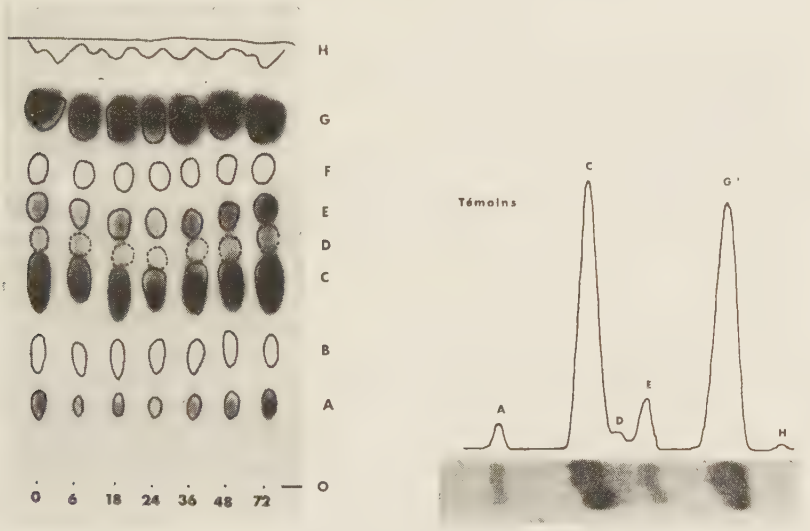

Fig. 6. — 6 a : Séparation sur une même plaque chromatographique des extraits lipidiques obtenus dans la série C, à chaque époque étudiée de l'hypertrophie compensatrice (témoin, 6 h., 18 h., 24 h., 36 h., 48 h., 72 h.,). Après l'obtention de l'autoradiogramme, la plaque d'acide silicique a été exposée aux vapeurs d'iode et les spots entourés et calqués. On a ici la photographie de l'autoradiogramme et du calque superposés.

6 b : Type d'autoradiogramme utilisé pour l'interprétation quantitative par densitométrie. On a fait figurer ici la courbe obtenue par une seule lecture au densitomètre pour plus de clarté. La dépose en trait permet souvent une meilleure séparation.

Signification des lettres : O = origine de la migration ; A : Lyso-lécithines ; B : Sphingomyélines ; C : Lécithines ; D : non identifié ; E : Phosphatidylinositols ; F : Phosphatidylsérines ; G : Phosphatidyléthanolamines ; H : Polyglycérophospholipides + graisses neutres.

a) *Série A.*

Les activités spécifiques des différents phospholipides et celle des phospholipides totaux au cours de l'hypertrophie compensatrice sont

représentées sur la figure 7 a (l'activité spécifique du P. acido-soluble, étudiée ci-dessus, a été reportée pour mémoire). Cette figure montre que l'activité spécifique des PhE est toujours nettement plus élevée que celle des autres phospholipides, aussi bien chez les rats témoins que chez les rats pris aux différentes heures après hépatectomie. Chez le rat témoin, les valeurs trouvées pour les PhE, PhI, PhC et L-Lec sont respectivement de 524, 169, 88 et 9.

Cependant, l'activité spécifique d'un constituant est de signification complexe. L'activité du précurseur intervient en particulier et l'on peut voir, sur la figure 7 a, l'importance des variations de celle-ci au cours de la période étudiée. L'activité spécifique, relative à l'activité spécifique du

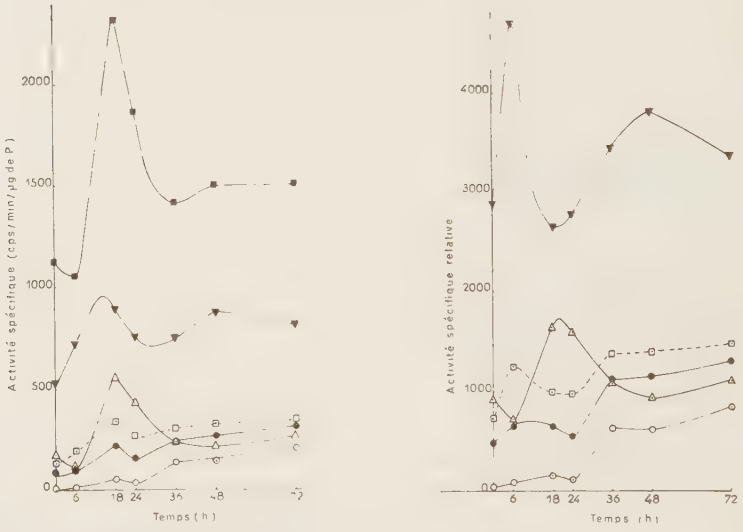

Fig. 7. — 7 a : Activités spécifiques des divers phospholipides, du P. lipidique total et du P. acido-soluble du noyau au cours de l'hypertrophie compensatrice (série A), et après 2 heures d'incorporation du précurseur pour chaque temps étudié.

7 b : Activités spécifiques relatives (série A) ; soit : activité spécifique $\times 10^3$/Activité spécifique du P. acido-soluble nucléaire.

■ ——— ■ : P. acido-soluble ; □ ------ □ : P. lipidique total.
▼ ——— ▼ : Phosphatidyléthanolamines.
Δ ——— Δ : Phosphatidylinositols ; ● ——— ● : Lécithines.
⊙ ——— ⊙ : Lyso-lécithines.

précurseur, est seule, pour un constituant, fonction de la vitesse de renouvellement d'une part, et de la synthèse nette d'autre part [43]. En période d'équilibre stationnaire pour ce constituant, c'est une mesure approchée de la vitesse de renouvellement. Elle a donc une signification physiologique précise. Les activités spécifiques relatives sont représentées sur la figure 7 b et ce sont ces résultats que nous allons commenter maintenant.

La courbe d'activité des phospholipides nucléaires totaux montre que l'hépatectomie stimule le métabolisme lipidique du noyau. Les valeurs obtenues pendant la régénération sont toutes nettement supérieures à la valeur trouvée chez les témoins. On peut distinguer deux parties dans cette courbe : avant les mitoses, où la courbe présente un pic à la 6e heure après l'ablation (72 p. 100 d'augmentation) au moment des mitoses (24 h - 36 h) où l'activité augmente de nouveau. Ensuite et jusqu'à 72 heures, les valeurs restent élevées, augmentent faiblement mais régulièrement (90 p. 100 à 105 p. 100 d'augmentation dans cette période). Cette courbe est une résultante qui ne peut être comprise que par l'examen des courbes intéressant les phospholipides individuels. Les phospholipides dont l'activité a été mesurée, montrent en effet des comportements différents.

Phosphatidyléthanolamines.

La courbe des PhE présente un pic précoce 6 heures après hépatectomie. L'augmentation est alors d'un peu plus de 60 p. 100. A la 18e heure, l'activité est retombée au niveau des valeurs témoins. Elle augmente ensuite de nouveau jusqu'à la 48e heure, moment où la courbe présente un deuxième pic. Nous avons vu précédemment qu'il y a, durant la phase prémitotique, augmentation importante de la quantité de PhE dans le noyau. Cette augmentation explique, selon nous, le premier pic. La multiplication cellulaire qui débute peu après 24 heures explique le deuxième pic d'activité.

Phosphatidylinositols.

La courbe d'activité spécifique relative des PhI montre un grand pic dont le sommet se situe vers 20 heures après hépatectomie et qui représente une augmentation de 85 p. 100. Or à ce moment, la quantité de PhI par noyau est pratiquement inchangée et d'autre part, les mitoses n'ont pas encore commencé puisque la synthèse du DNA débute à peine (paragraphe 1). Ce pic ne peut donc être imputé à une synthèse mais traduit une augmentation de la vitesse de renouvellement. A partir de la 24e heure, il y a, nous l'avons vu, augmentation de la quantité de PhI dans les noyaux, et ensuite synthèse due à la multiplication cellulaire, deux faits qui tendent à augmenter l'activité spécifique. Cela explique la légère traînée du pic et la remontée qui suit. La courbe d'activité des PhI est la seule courbe qui présente une valeur abaissée, durant les premières heures après hépatectomie. Il est à noter également que le pic d'activité des PhI se situe juste avant celui du DNA (24 h).

Lécithines et Lyso-lécithines.

Les courbes des PhC et L-Lec ont la même allure traduisant une importante augmentation de l'activité après la 24e heure et jusqu'à la 36e heure. L'activité des PhC est multipliée par 2, celle des L-Lec par 5. Durant cette période, la quantité de PhC, rapportée au DNA, ne varie pas et celle des L-Lec diminue légèrement. Mais c'est dans cette période que la vague

des mitoses commence puis devient maximum. Il est donc raisonnable de penser que c'est la synthèse de nouveaux noyaux qui explique l'augmentation d'activité des PhC et des L-Lec. Après 36 heures, les activités restent élevées. A la 72e heure, l'activité des PhC est 2,6 fois celle que l'on trouve chez les rats témoins, l'activité des L-Lec, 17 fois. Il est vraisemblable que ces activités élevées trouvées entre les 48e et 72e heures après hépatectomie alors que les mitoses sont achevées et tandis que les quantités par noyau des deux lipides varient très peu, sont le témoignage d'une augmentation de la vitesse de renouvellement.

On peut noter également, en observant ces deux courbes, que le métabolisme des deux lipides est stimulé dès les premières heures. Pour les PhC, l'activité spécifique relative est augmentée d'environ 40 p. 100 à la 12e heure. La légère synthèse rapportée plus haut explique en partie cela, mais l'étalement de cette augmentation d'activité montre qu'il s'y ajoute vraisemblablement une légère augmentation de la vitesse de renouvellement. Pour les L-Lec, l'activité spécifique relative a une valeur double de la valeur témoin dès la 6e heure, triple à la 18e heure. A la 24e heure, l'activité est 2,5 fois celle des témoins. Or pendant tout ce temps, la quantité de L-Lec est constante pour un noyau. C'est donc une vitesse de renouvellement accrue, et ici encore de façon plus importante que pour les PhC, qui est en cause.

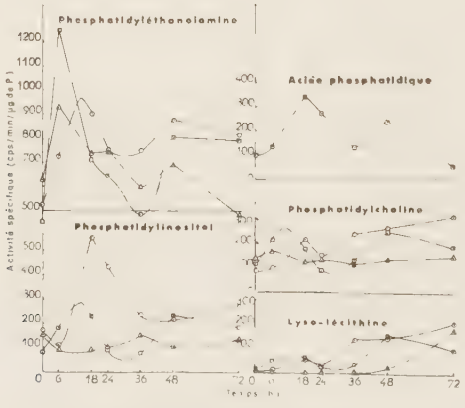

Fig. 8. — Activités spécifiques des divers phospholipides nucléaires au cours de l'hypertrophie compensatrice et après 2 heures d'incorporation du précurseur pour chaque temps étudié.
⊙——⊙ : Série A ; □——□ : Série B ; Δ——Δ : Série C.

b) *Comparaison avec les séries B et C.*

La comparaison des courbes d'activité spécifique de chaque phospholipide, obtenues dans les 3 séries étudiées, a été réalisée sur la figure 8, les activités spécifiques relatives n'ayant pas été calculées pour les séries B et C.

Il est, rappelons-le, difficile de comparer des séries différentes, en particulier quand on ne possède pas l'activité du pool précurseur de phosphore dans chaque cas. Dans le cas présent, nous avons deux séries (B et C) de rats de même souche, la série A étant de souche différente. D'autre part, si les rats des séries A et B sont d'âge voisin, la série C est par contre constituée de rats ayant pratiquement 1 an. Or il est bien établi [27, 44] que de tels rats donnent à l'hépatectomie partielle, une réponse nettement retardée (pic d'activité du DNA vers 30-32 heures au lieu de 24-25 heures chez des rats de 6 mois et 22 heures chez de jeunes adultes), de plus faible amplitude et étalée dans le temps. Nous verrons plusieurs faits qui rendent très probable un tel comportement pour les rats de la série C. Cela étant, il semble que la comparaison entre les 3 séries apporte néanmoins des faits sûrs et confirme la plupart des conclusions apportées par l'observation de la série A.

Chez les rats témoins tout d'abord, l'activité des PhE est toujours très supérieure à celle des autres phospholipides. Cela confirme les résultats obtenus antérieurement par Gurr et al. [20]. L'activité des PhI est de même ordre de grandeur que celle des PhC dans les séries B et C. Elle est presque le double de celle des PhC dans la série A. Dans les trois séries, l'activité des L-Lec est très faible, environ 10 fois plus faible que celle des PhC de la même série. Il est curieux de constater que, pour la série C, l'activité des PhC et celle des L-Lec sont très voisines des valeurs correspondantes dans les deux autres séries bien que la répartition des lipides à choline soit très différente. L'activité des « PhA » n'a été mesurée que dans la série B. Chez les rats témoins, elle est du même ordre de grandeur que l'activité des PhC et des PhI.

En ce qui concerne l'évolution de l'activité des phospholipides au cours de l'hypertrophie compensatrice, nous comparerons successivement les différents constituants.

Phosphatidyléthanolamines.

Dans les 3 séries, les courbes sont très semblables : soit un pic important et précoce, une activité plus faible entre la 24e et la 36e heure et un 2e pic moins important à la 48e heure. Pour les séries B et C, le 1er pic est un peu plus précoce que celui des PhE de la série A, et l'activité à la 36e heure est très abaissée, revenant au niveau des valeurs témoins. Par ailleurs, entre la 18e et la 24e heure, les courbes des séries B et C présentent un épaulement qui n'existe pas sur la courbe obtenue dans la série A. Cela étant, on ne constate pas de décalage dans le temps, en particulier entre la série C et la série B (rats de même souche). Il apparaît seulement que pour la série C, l'amplitude des variations d'activité des PhE est beaucoup plus faible que ce que l'on constate pour la série B et également pour la série A.

Phosphatidylinositols.

Les séries B et C ne montrent pas de variations de l'activité des PhI de l'ampleur de celles observées dans la série A. La série B présente un

pic un peu plus précoce que celui de la série A. La série C, par contre, présente un pic très étalé, tardif et de très faible amplitude. Cela est vraisemblablement la marque de l'âge des rats de cette série. Si l'on tient compte des résultats de Bucher et al. [44], le faible pic d'activité des PhI, dans la série C, recouvrirait la période durant laquelle la synthèse de DNA a lieu pour des rats de cet âge, et il aurait les mêmes caractéristiques cinétiques. Cela rejoindrait la constatation faite dans la série A, d'un synchronisme entre le pic d'activité du DNA et celui des PhI. La courbe obtenue dans la série B présente un 2e pic à la 48e heure. Ce fait est difficilement interprétable dans l'ignorance où nous sommes de l'activité du précurseur.

Lécithines et Lyso-lécithines.

En ce qui concerne les lipides à choline, c'est la série C qui diffère le plus des deux autres séries et cela pouvait être attendu étant donné la distribution très anormale des PhC et des L-Lec dans cette série. L'activité des PhC ne varie pratiquement pas durant toute la période étudiée alors que pour les deux autres séries, l'activité augmente sensiblement à partir de 24 heures. L'activité des PhC, dans la série B, augmente beaucoup dans les premières heures, mais cela peut être dû pour une bonne part à l'activité du précurseur puisque, pour quatre phospholipides sur les cinq étudiés dans cette série, les activités des premières heures sont élevées : les PhE présentent un pic très élevé, l'activité des PhI n'est pas abaissée à la 6e heure après hépatectomie, comme dans les autres séries et les L-Lec ont également une activité élevée dès les premières heures.

Les L-Lec, dans les 3 séries, montrent une très importante augmentation de leur activité spécifique : à partir de la 30e heure environ pour les séries A et B, entre 36 et 48 heures pour la série C. Les valeurs maximum atteintes représentent 10 fois la valeur des témoins pour la série B, 16 fois pour la série C et 22 fois pour la série A.

On constate que pour la série C le phénomène est là encore plus tardif et plus étalé. Cependant le niveau d'activité à la 72e heure est tout aussi élevé que celui atteint par les autres séries. On n'observe pas d'autre part pour cette série, à partir de 36 heures tout au moins, le parallélisme que l'on constate dans les séries A et B, entre les courbes d'activité des PhC et des L-Lec. L'activité des L-Lec devient même, à la 72e heure, supérieure à celle des PhC. Il est à noter que pour cette série, la quantité de L-Lec diminue beaucoup : les L-Lec représentent 23 p. 100 des phospholipides chez les témoins, 16 p. 100 encore à la 36e heure après hépatectomie. A 48 heures, elles n'en représentent plus que 6 p. 100 et à la 72e heure, 3 p. 100, proportion la plus faible qui ait été trouvée dans les 3 séries. Or nous savons, par la série A, que la quantité par noyau des phospholipides ne varie pas. L'augmentation de l'activité spécifique des L-Lec de la série C que l'on constate à partir de la 40e heure environ, signifie donc une augmentation considérable de la vitesse de renouvellement de ce phospholipide.

Acides phosphatidiques et polyglycérophospholipides.

L'activité des « PhA » n'était mesurable que dans la série B. La courbe d'activité spécifique de ces constituants présente un pic très important à la 18e heure et un pic moins important à la 48e heure. Quelle que soit l'évolution de l'activité du P. acido-solubles, il est vraisemblable qu'il existe dans la période prémitotique de cette série une époque durant laquelle l'incorporation dans les « PhA » est augmentée.

Nous avons par ailleurs constaté une synthèse de « PhA » dans la période prémitotique, pour la série A. Il est difficile cependant de tirer des conclusions concernant ces constituants puisque nous ne possédons pas, pour une même série, les données quantitatives à côté des données concernant l'incorporation du ^{32}P.

Discussion.

Le but de ces recherches était de suivre le comportement individuel des phospholipides nucléaires durant l'hypertrophie compensatrice. Nous avons donc été conduit à étudier également les phospholipides du noyau de foie normal. Nous discuterons ces résultats avant d'analyser ceux exposés ci-dessus concernant le noyau de foie en hypertrophie compensatrice.

1. *Phospholipides du noyau de foie normal.*

a) *Quantité de phospholipides totaux par noyau.*

Utilisant la méthode de Chauveau et al. [5] pour isoler les noyaux, nous obtenons un rapport P. lipidique/P.DNA égal à 0,10 si les lipides ne sont pas lavés avant dosage, 0,09 s'ils le sont. Cela est tout à fait en accord avec ce qui a été obtenu par d'autres auteurs sur de tels noyaux. Cette méthode d'isolement livre en effet des noyaux bien préservés, possédant en particulier leur double membrane.

b) *Composition en phospholipides individuels.*

Si nous comparons nos résultats à ceux déjà publiés par d'autres auteurs [8, 10-13], nous observons certaines différences qui proviennent vraisemblablement de la méthode d'analyse des lipides. La différence la plus nette concerne les L-Lec. D'après les résultats des séries A et B, nous discuterons plus loin le cas de la série C, les L-Lec représentent 9 à 10 p. 100 des phospholipides du noyau. Dans la littérature, seuls Altman et al. [12] signalent des L-Lec dans le noyau (de poumons de mouton). Ces auteurs utilisent la même méthode de séparation que nous (Skipsky et al. [32]) qui permet une très bonne séparation des lipides à choline. Par contre, Nelson et al. [11] utilisent une méthode de séparation sur papier imprégné d'acide silicique, dans un solvant ne permettant pas l'isolement des L-Lec. Gurr et al. [10] analysent les phospholipides par chromatographie de leurs produits d'hydrolyse et ne distinguent donc pas, si elles sont présentes, les L-Lec des PhC. Enfin Song et al. [13]

utilisent la séparation de Marinetti [45] sur papier imprégné d'acide silicique avec laquelle les L-Lec migrent dans une zone où migrent, à des rf voisins, les Sph et surtout les PhI.

La méthode d'extraction des lipides que nous utilisons se passe dans un temps court et sans utiliser de solvants chauds. D'autre part, le comportement des L-Lec au cours de l'hypertrophie compensatrice élimine l'idée d'un artefact expérimental. Les L-Lec sont donc bien un constituant du noyau et cela se présente comme une particularité du noyau par rapport aux autres structures subcellulaires.

Fig. 9. — Autoradiogramme obtenu à partir d'un extrait lipidique de noyaux de foie de rats normaux, après 2 heures d'incorporation du ^{32}P. Solvant utilisé : Chloroforme - Méthanol - Acide acétique - eau 50 30 8 5 (V V). Le spot H est nettement dédoublé. Dans ce solvant, le constituant D passe avec les lecithines (pour la signification des lettres, voir Fig. 6).

Pour les autres phospholipides, les différences sont moins nettes. Cependant, nous trouvons toujours moins (entre 12 et 14 p. 100 de l'ensemble des phospholipides) de PhE qu'indique dans la littérature, alors que nos valeurs pour les PhC sont un peu plus élevées. Cependant le spot des PhC, dans la méthode de séparation que nous utilisons, renferme comme nous l'avons dit, des phospholipides mineurs comptant pour 3 à 5 p. 100 de l'ensemble des phospholipides. Les Sph sont faiblement représentées (1 p. 100) ; les PhI sont présents, à raison de 6 à 7 p. 100. Les PhS ne

sont présentes qu'à raison de 3 p. 100. Enfin nous trouvons de façon régulière des phospholipides ayant le comportement chromatographique d'acides phosphatidiques et de polyglycérophosphatides. Ils sont présents à raison de 2,5 à 3,5 p. 100 des phospholipides totaux. Song et al. [13] rapportent 2,5 p. 100 de cardiolipides. Ce constituant, que nous appelons « PhA » et qui contient 3 p. 100 des phospholipides totaux chez un rat témoin, est formé de deux composés. Il suffit en effet de séparer les lipides sur une plaque d'acide silicique H (Merck) dans un solvant contenant un peu moins d'acide acétique, pour que le spot se dédouble (voir Fig. 9). Nous retrouvons d'ailleurs ces composés dans le nucléole [46] où ils constituent 7 p. 100 des phospholipides nucléolaires totaux. Rose et al. [47] en trouvent de 3 à 5 p. 100 dans les fractions subnucléaires qu'ils isolent à partir de noyaux de lymphocytes de thymus de veau, 3 à 4 p. 100 dans la chromatine, 5 p. 100 dans la fraction qu'ils supposent être des nucléoles fragmentés.

La composition des phospholipides des rats témoins de la série C est, nous l'avons vu, tout à fait particulière pour ce qui concerne les lipides à choline ; la proportion globale des Lec et L-Lec est pratiquement la même que celle obtenue avec les rats témoins des séries A et B (71,4 p. 100 au lieu de 70,6 p. 100 et 68,1 p. 100) mais les L-Lec représentent plus du 1/3 de cette quantité alors qu'elles n'en constituent que le 1/7 pour les séries A et B. D'autre part, la proportion des Sph est presque deux fois celle obtenue dans les séries A et B. Finalement la part globale des lipides à choline est plus importante que pour les séries A et B (79 p. 100 au lieu de 75 p. 100 et 73 p. 100).

Nous ne pouvons *a priori* rattacher ce phénomène qu'à l'âge des rats de cette série ; cela demande confirmation, mais l'évolution de la composition des phospholipides de cette série au cours de l'hypertrophie compensatrice milite en faveur d'une telle hypothèse : à partir de la 36e heure, c'est-à-dire au moment où commencent les mitoses pour cette série, les proportions des 3 lipides à choline redeviennent progressivement celles que l'on observe pour les séries A et B. La vague des mitoses représente un véritable rajeunissement du tissu hépatique et il est remarquable de constater qu'à ce moment-là, la composition des phospholipides du noyau redevient celle que l'on observe chez des rats plus jeunes.

2. *Phospholipides nucléaires et hypertrophie compensatrice.*

a) *Phospholipides totaux.*

Nous avons constaté d'une part que la quantité des phospholipides totaux par noyau ne varie pratiquement pas par rapport aux valeurs témoins et d'autre part que l'activité spécifique de ces phospholipides totaux est augmentée durant toute la période étudiée. Cette augmentation avait été trouvée par Lemaire et al. [16] chez des rats pris à la 26e heure après hépatectomie partielle, de même que Lévy et al. [18] chez des rats pris en période prémitotique et mitotique. Ces auteurs ont injecté le précurseur marqué, 4 heures avant le sacrifice. Au contraire, Gurr et

al. [20] n'ont pas trouvé de différence significative entre des rats pris au moment des mitoses et des rats témoins ; ici, le précurseur était injecté 6 heures avant le sacrifice. C'est vraisemblablement la raison principale des différences entre les résultats. Nous n'avons utilisé que 2 heures d'incorporation. Il nous semble en effet que 6 heures d'incorporation est un temps beaucoup trop long face à la succession des phénomènes qui se déroulent dans un foie en régénération.

Le mode d'expression des résultats peut également expliquer en partie certaines différences. Levin et al. [18] utilisent un coefficient qui tient compte du poids de l'animal. Smellie et al. [16], de même que Gurr et al. [20] rapportent les activités spécifiques à celle du P. acido-soluble du foie. Nous rapportons les activités spécifiques à celle du P. acido-soluble du noyau, nous appuyant sur les résultats de Rose et al. [47] montrant l'incorporation de précurseurs lipidiques par des noyaux isolés, incorporation qui traduit des synthèses dans le noyau.

b) *Phospholipides individuels.*

— *Phosphatidyléthanolamines.* Nous avons constaté une augmentation précoce de l'activité des PhE qui, d'après la série A, est la marque d'une synthèse importante dès les premières heures, portant la concentration rapportée au DNA à une valeur presque double de celle des noyaux témoins. Et cette concentration reste élevée durant toute la période étudiée. La courbe de synthèse nette a une pente très rapide entre 0 et 6 heures. La valeur atteinte à 72 heures est très élevée. La signification de ces résultats ne peut être éclaircie qu'à l'aide d'expériences complémentaires. Il est vraisemblable que cette synthèse précoce est liée à d'autres synthèses précoces. De nombreux travaux ont montré que l'hépatectomie partielle provoque, dans les toutes premières heures qui suivent, des synthèses importantes des RNA nucléaires et nucléolaires, précédées par la synthèse des systèmes enzymatiques nécessaires [38-41]. Et Frayssinet [19] avait constaté que l'augmentation importante de la quantité de RNA nucléaire total ne décroît légèrement qu'après la 48e heure et que le taux normal n'est retrouvé que 3 jours après l'opération. On peut donc envisager, à titre d'hypothèse, que les PhE sont impliquées, à un niveau ou à un autre, dans les systèmes enzymatiques synthétisant les RNA nucléaires puisque eux aussi présentent une élévation de concentration précoce et durable. Par ailleurs, cette augmentation importante de la quantité de PhE est en accord avec les observations histochimiques de Gahan [25] sur un foie examiné 24 heures après hépatectomie partielle.

— *Phosphatidylsérines.* L'absence de courbe d'activité spécifique ne permet pas de tirer de conclusions nettes. Cependant, on peut souligner que le pourcentage des PhS par rapport aux phospholipides totaux reste très constant et que leur concentration, rapportée au DNA, est augmentée en moyenne de 15 à 30 p. 100 pendant la période étudiée.

— *Phosphatidylinositols.* On constate pour eux un comportement particulier. Au moment où débute la synthèse de DNA, on observe une

importante augmentation de leur vitesse de renouvellement. On est tenté de supposer qu'ils pourraient être impliqués dans les systèmes enzymatiques responsables de la synthèse du DNA. Indépendamment de nos résultats, les faits suivants viennent à l'appui de cette idée : 1) dans le cas du foie de rat, c'est dans le noyau que l'incorporation de ^{32}P est la plus importante [20] ; 2) il a été montré que l'action antimitotique de la colchicine pouvait être empêchée par le méso-inositol [48-50]. Ce résultat n'a cependant pas été retrouvé de façon nette par Taylor [51].

— *Polyglycérophospholipides et Acides phosphatidiques.* Nous avons constaté, dans l'une des 3 séries, une augmentation de la quantité de ces constituants et dans une autre, un pic important d'activité spécifique ; dans les deux cas, cela a lieu pendant la période prémitotique. Il est vraisemblable que les acides phosphatidiques interviennent dans le métabolisme des PhI dont ils sont les précurseurs directs.

— *Phospholipides à choline.* Les lipides à choline constituent la plus grande partie des phospholipides du noyau. Nous avons vu qu'ils se distinguaient de façon homogène des autres phospholipides par des variations quantitatives de faible amplitude. Tous les trois atteignent des niveaux de synthèse nette identiques à 72 heures (100 p. 100).

Par contre, les sphingomyélines mises à part, dont l'incorporation en ^{32}P n'a pu être suivie, ils présentent des variations d'activité parfois très notables, et ces variations s'effectuent de façon synchrone pour les PhC et les L-Lec. Dès les premières heures, nous avons pu observer d'après la série A, une augmentation de la vitesse de renouvellement de ces deux types de lipides, plus importante pour les L-Lec que pour les PhC. Une variation très précoce de la vitesse de renouvellement de phospholipides nucléaires peut logiquement être, en première hypothèse, reliée au fonctionnement de la membrane plutôt qu'à celui des structures intranucléaires. On sait d'ailleurs qu'il y a une modification du comportement électrophorétique de la membrane nucléaire, détectable entre 2 et 6 heures après l'opération [52].

Nous constatons ensuite, entre 24 heures et 36 heures, une très importante augmentation d'activité, identique pour les deux phospholipides, dans les séries A et B, que nous interprétons cette fois comme la marque du début de l'installation des mitoses. Il y a en effet à ce moment-là, synthèse de nouveaux noyaux, dont formation de nouvelles membranes. Une fois les mitoses achevées, nous n'observons pas comme pour les PhE par exemple, une baisse de l'activité spécifique de ces deux lipides. Nous avons vu que cela ne pouvait être dû qu'à une augmentation de la vitesse de renouvellement. Il est possible que les membranes nouvellement synthétisées soient encore pendant un certain temps, le siège d'une activité métabolique plus élevée. L'augmentation très importante de l'activité des L-Lec est à souligner. Elle signifie une augmentation considérable de la vitesse de renouvellement de ces molécules durant toute la période étudiée mais surtout après les mitoses. Ce fait suggère un rôle d'intermédiaire métabolique. Il a été proposé pour le fonctionnement de la membrane plasmique et le maintien de sa structure, un cycle Léci-

thines-Lyso-lécithines [53]. Il est évident que si un tel cycle existait au niveau du noyau, les augmentations d'activité spécifique des PhC et des L-Lec seraient identiques en valeur absolue. Le parallélisme entre les courbes d'activités des PhC et des L-Lec que nous constatons dans les séries A et B durant les phénomènes qui suivent l'hépatectomie suggère une telle explication. Et dans cette hypothèse, l'accumulation de L-Lec au détriment des Lec, que l'on observe dans la série C, serait bien la marque d'une plus grande inertie métabolique due au vieillissement du tissu hépatique.

Conclusion.

Nous avons constaté au cours des 72 premières heures de l'hypertrophie compensatrice du foie qu'en dépit d'une constance nette de la quantité des phospholipides du noyau durant cette période, il existe une nette stimulation du métabolisme global des phospholipides, évaluée par l'incorporation du ^{32}P.

Nous avons vu que cette stimulation recouvre pour les divers types de phospholipides des événements différents par leur structure et le moment où ils se produisent après l'opération. Nos résultats nous semblent intéressants parce qu'ils soulignent que le terme « phospholipides totaux » recouvre un ensemble de composés dont les rôles sont multiples et souvent spécifiques pour chaque type.

Nous avons montré, dans cette recherche concernant le noyau de la cellule hépatique en hypertrophie et en hyperplasie qu'au niveau de cette structure et pendant les phénomènes préparant et suivant les mitoses, on peut distinguer une évolution nettement différente pour les divers phospholipides. Nos résultats montrent que l'estérification de la deuxième fonction de l'acide phosphorique d'un acide phosphatidique soit par la choline, soit par l'éthanolamine ou par l'inositol, conduit à des molécules ayant un rôle déterminé, au sein de la membrane ou des divers systèmes enzymatiques.

Une expérimentation plus étendue, plus approfondie, est nécessaire pour vérifier les liens que nous avons postulés entre le métabolisme lipidique du noyau et les événements fondamentaux de l'hyperplasie qui suit l'hypertrophie du foie en régénération. En particulier, l'emploi d'inhibiteurs spécifiques de la mitose nous permettra de dissocier ou non le processus mitotique de l'incorporation du ^{32}P dans les divers phospholipides.

Nos résultats biochimiques donnent plus de force aux observations histochimiques (voir Introduction) qui ont révélé la présence de phospholipides dans le matériel chromosomique lors de la mitose. Serra [24] pense que le noyau comporte des phases plus ou moins riches en lipides, en rapport avec l'apparition des chromosomes lors de la prophase et leur disparition comme corps fixables, identifiables comme tels, au cours de la télophase. Il suggère que les lipides auraient de ce fait un rôle épigénétique. A cet égard, nous pensons faire le même genre d'étude que celle

rapportée ici sur le noyau entier, en nous adressant aux fractions subnucléaires, en particulier en distinguant la membrane que l'on peut désormais isoler quantitativement [54], des structures intranucléaires.

Nous remercions vivement M. C. Frayssinet et P. Lemarchal pour l'intérêt qu'ils ont porté à cette étude et les idées qu'ils nous ont apportées et M^me W. Ziolkowski-Diplo pour sa contribution à la réalisation technique de ce travail.

Summary.

A quantitative study of the different phospholipids of regenerating rat-liver nuclei during the first 72 hours which follow partial hepatectomy (removal of 70 p. 100 of the liver) was made after their separation by thin-layer chromatography. The uptake of ^{32}P into nuclear phospholipids (2 hours after intraperitoneal injection) has been also investigated for each post-operative time studied.

The following facts are observed :

1. The phospholipid content of regenerating rat-liver nuclei is very constant during the entire period under study, being only slightly higher (15 % to 20 %) than the content of normal rat-liver nuclei.

2. Soon, a significant quantity of phosphatidylethanolamines is synthetised which reaches a maximum (> 90 %) about 18 hours post-operatively. The phosphatidylethanolamine content of the nuclei stays high during all the period studied.

3. The rate of turnover of phosphatidylinositols increases significantly just before DNA synthesis and the phosphatidylinositol content of nuclei is increased during mitosis (45 %).

4. The amount of the different choline-lipids in the nuclei are not much changed. The rate of turnover of lecithins and lysolecithins increase simultanously during all the period studied but particularly just after mitosis. The increase of turnover of lysolecithins is always more significant than that of lecithins.

These data give us the way to postulate some specific role for the different phospholipids in relation to the fundamental events of liver regeneration.

Zusammenfassung.

Die quantitative Untersuchung der verschiedenen Phospholipide aus den Kernen der Rattenleber während der ersten 72 Stunden der ausgleichenden Hypertrophie, welche auf die Ablation von 70 % der Leber folgt, wurde nach ihrer Trennung durch Dünnschicht-Chromatographie durchgeführt. Der Einbau von ^{32}P in die Kern-Phospholipide (2 Stunden nach intraperitonealer Einspritzung) wurde ebenso für jede post-operative Stufe untersucht.

Folgende Tatsachen konnten nachgewiesen werden :

1. Die Menge der gesamten Phospholipide pro Kern ist sehr konstant für die ganze untersuchte Periode, und ist ein wenig grösser (15 bis 20 %) als die in den Kernen der normalen Leber gefundene Menge.

2. Die Phosphatidyläthanolamine weisen sehr früh eine beträchtliche Synthese (> 90 %) auf, welche maximal in der 18. Stunde nach der Operation ist. Die Menge der Phosphatidyläthanolamine pro Kern bleibt während der ganzen untersuchten Periode hoch.

3. Die Phosphatidylinositole zeigen eine beträchtliche Zunahme ihrer Erneuerungsgeschwindigkeit kurz vor der DNS-Synthese und eine Zunahme ihrer Menge pro Kern (45 %) in der Zeit der Mitosen.

IMPRIMERIE M. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.